

C14

Insulin

DERWENT-ACC-NO: 1983-807919

DERWENT-WEEK: 200173

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Mono:clonal anti:insulin antibodies
- useful for determin. of insulin blood levels in
diabetes treatment

PRIORITY-DATA: 1983US-0480142 (March 29, 1983)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	
LANGUAGE		MAIN-IPC	
US N6480142 N		August 9, 1983	N/A
024	N/A		
DE 3411472 A		October 18, 1984	N/A
000	N/A		
JP 60057253 A		April 3, 1985	N/A
000	N/A		
CH 666490 A		July 29, 1988	N/A
000	N/A		

INT-CL (IPC): A61K039/39, C07G007/00 , C12N005/00 ,
C12N015/00 ,
C12P021/00 , C12R001/91 , G01N033/54

ABSTRACTED-PUB-NO: US 6480142A

BASIC-ABSTRACT:

Anti-insulin antibodies (I) are secreted by cell lines made by the hybridisation of insulin-immune lymph node cells and a myeloma cell line, SP2/0-Ag 14. These cell lines and their corresp. monoclonal antibodies are designated AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7, BE3F9 and CE9H9.

The monoclonal antibodies specify particular insulin amino acid sequences and

so are useful for the determin. of insulin levels in human blood. The circulating levels of various insulins, e.g. human, beef, pork, rat, chicken, fish, guinea pig, sheep and mouse insulins, can be determined, so that diabetes treatment can be monitored. With the antibodies mapping of antigenic sites on insulin is possible. They are cross-reactive and 2 antibodies are used for determin. of insulin specificity.

Anti-insulin antibodies (I) are secreted by cell lines made by the hybridisation of insulin-immune lymph node cells and a myeloma cell line, SP2/0-Ag 14. These cell lines and their corresp. monoclonal antibodies are designated AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7, BE3F9 and CE9H9.

The monoclonal antibodies specify particular insulin amino acid sequences and so are useful for the determin. of insulin levels in human blood. The circulating levels of various insulins, e.g. human, beef, pork, rat, chicken, fish, guinea pig, sheep and mouse insulins, can be determined, so that diabetes treatment can be monitored. With the antibodies mapping of antigenic sites on insulin is possible. They are cross-reactive and 2 antibodies are used for determin. of insulin specificity.

ABSTRACTED-PUB-NO: US N6480142N

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

----- KWIC -----

Title - TIX (1):

Mono:clonal anti:insulin antibodies - useful for determin. of insulin blood levels in diabetes treatment

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3411472 A1

⑤ Int. Cl. 3:
C 12 P 21/00
G 01 N 33/54
C 12 N 15/00
C 07 G 7/00

⑳ Aktenzeichen: P 34 11 472.6
㉑ Anmeldetag: 28. 3. 84
㉒ Offenlegungstag: 18. 10. 84

DE 3411472 A1

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③④
29.03.83 US 480142

⑦① Anmelder:

The United States of America, represented by the
Secretary, U.S. Department of Commerce,
Springfield, Va., US

⑦④ Vertreter:

Boehmert, A., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.; Stahlberg, W.,
Rechtsanw.; Hoormann, W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.;
Goddard, H., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., 2800 Bremen;
Eitner, E., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 8000 München;
Kuntze, W., Rechtsanwalt, 2800 Bremen;
Neidl-Stippler, C., Dipl.-Chem.Dr.phil.nat.,
Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:

Schroer, Joyce Ann, Rockville, Md., US

⑤④ Verfahren zum Bestimmen der Anwesenheit von Insulin, Antiinsulinantikörper, Verfahren zur Bestimmung des menschlichen Insulinniveaus und Verfahren zur Bestimmung von Humaninsulin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen der Anwesenheit von Insulin mittels Antiinsulin-Antikörper abgebenden Zelllinien, ausgewählt aus der Gruppe folgender Zelllinien: AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7, BE3F9 und CE9H9, sowie einen Antiinsulinantikörper, der von einer zur Bestimmung von Insulin eingesetzten Zelllinie, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7, BE3F9 und CE9H9 sekretiert wird und außerdem Verfahren zur Bestimmung des menschlichen Insulin-Niveaus durch Einsetzen von Kombinationen monoklonaler Antikörper bestimmter Spezifität, wobei die Antikörper von den Zelllinien gemäß Anspruch 1 sekretiert wurden, um endogene Insulinsekretion von exogener Insulininjektion zu unterscheiden und zur Bestimmung des Human-Insulin-Niveaus durch Herstellen monoklonaler Antiinsulinantikörper durch in Kontaktbringen eines Paares dieser Antikörper mit dem zu untersuchenden Insulin; und Bestimmen der Affinität jedes Antikörpers durch ein Assay, ausgewählt aus Radioimmunassay, Doppelbindungassay oder irgend einem anderen geeigneten biologisch akzeptablen Assay.

DE 3411472 A1

A n s p r ü c h e
=====

1. Verfahren zum Bestimmen der Anwesenheit von Insulin mittels Antiinsulinantikörper abgebenden Zelllinien, ausgewählt aus der Gruppe folgender Zelllinien: AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7, BE3F9 und CE9H9.
2. Verfahren zum Bestimmen der A-Kette von Insulin, gekennzeichnet durch Verwendung einer als AE9D6 bezeichneten Antiinsulinantikörper sekretierenden Zelllinie.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelllinie DB9G8 ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelllinie CC9C10 ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelllinie CG7C7 ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelllinie BE3F9 ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelllinie CE9H9 ist.
8. Antiinsulinantikörper, der von einer zur Bestimmung von Insulin eingesetzten Zelllinie, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7,

BE3F9 und CE9H9, sekretiert wird.

9. Verfahren zur Bestimmung des menschlichen Insulinniveaus gekennzeichnet durch Einsetzen von Kombinationen monoklonaler Antikörper bestimmter Spezifität, wobei die Antikörper von den Zelllinien gemäß Anspruch 1 sekretiert wurden, um endogene Insulinsekretion von exogener Insulininjektion zu unterscheiden.

10. Verfahren zur Bestimmung des Human-Insulin-Niveaus, gekennzeichnet durch Herstellen monoklonaler Antiinsulinantikörper gemäß Anspruch 1; In-Kontakt-Bringen eines Paares dieser Antikörper mit dem zu untersuchenden Insulin; und Bestimmen der Affinität jedes Antikörpers durch ein Assay, ausgewählt aus Radioimmunassay, Doppelbindungsassay oder irgend einem anderen geeigneten biologisch akzeptablen Assay.

3411472

NAOHGEREICH

3

BOEHMERT & BOEHMERT

ANWALTSSOZIELTÄT

Boehmert & Boehmert, Postfach/P. O. Box 107127, D-2800 Bremen 1

An das
Deutsche Patentamt
Zweibrückenstrasse 12

8000 München 2

PATENTANWALT DR.-ING. KARL BOEHMERT (1933-1973)
PATENTANWALT DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, * BREMEN
RECHTSANWALT WILHELM J. H. STAHLBERG, BREMEN
PATENTANWALT DR.-ING. WALTER HOORMANN, * BREMEN
PATENTANWALT DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, * BREMEN
PATENTANWALT DIPL.-ING. EDMUND F. EITNER, * MÜNCHEN
RECHTSANWALT WOLF-DIETER KUNTZE, BREMEN
PATENTANWÄLTIN DIPL.-CHEM. DR. C. NEIDL-STIPPLER, * MÜNCHEN
* EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

Ihr Zeichen
Your ref.

Neuanmeldung

Ihr Schreiben vom
Your letter of

Unser Zeichen
Our ref.

UXM 180

Bremen,
Hollerallee 32

28. März 1984

THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by the Secretary,
United States Department of Commerce, Springfield,
Virginia 22161, U. S. A.

Verfahren zum Bestimmen der Anwesenheit von Insulin,
Antiinsulinantikörper, Verfahren zur Bestimmung des menschlichen
Insulinniveaus und Verfahren zur Bestimmung von Humaninsulin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen der
Anwesenheit menschlichen Insulins, Antiinsulinanti-
körper, ein Verfahren zur Bestimmung des menschlichen In-
sulinniveaus und Verfahren zur Bestimmung von Humaninsulin.

Antiinsulinantikörper sekretierende Zelllinien wurden durch
Hybridisierung von insulinimmunen Lymphknotenzellen mit
der Myelomazelllinie SP2/O-Ag14 hergestellt. Dies erfolgte,

88

Büro Bremen / Bremen Office:

Postfach / P. O. Box 107127
Hollerallee 32, D-2800 Bremen 1
Telephon: (04 21) * 34 9071
Telekopierer / Telecopier: CCITT 2
Telegr. / Cables: Diaeramm Bremen

Konten / Accounts Bremen:

Bremer Bank, Bremen
(BLZ 290 800 10) 100144 900
Deutsche Bank, Bremen
(BLZ 290 700 50) 111 2002
Bank für Gemeinwirtschaft, München
(BLZ 290 100 10) 12007 2000

Büro München/Munich Office (nur Patentanwälte)

Postfach / P. O. Box 22 01 37
Schlotthauerstraße 3, D-8000 München 22
Telephon: (089) 22 33 11
Telekop. / Telecop.: (089) 22 15 69 CCITT 2
Telegr. / Cables: Forbopal München

um monoclonale Antiinsulinantikörper bekannter Spezifität zur Untersuchung und Bestimmung der Immunantwort auf Insulin herzustellen. Die Untersuchung kann auf Test-Sets eingeschränkt werden. Diese Antikörper sind als Diagnostika für menschliche Insulinniveaus wertvoll.

Die Erfindung läßt sich auf verschiedene Insulintypen anwenden, die eigentümlich für das Tier oder den Menschen sind, von welchen sie abstammen; beispielsweise für Humaninsulin, Rinderinsulin, Schweineinsulin, Mausinsulin, Hühnerinsulin und Ratten-, Kaninchen-, Fisch-, Guineaschwein- und Schafinsuline.

Die Insulin-mAb-Antikörper in den diese Antikörper sekretierenden Zelllinien sind zur Bestimmung der zirkulierenden Niveaus im Blut für unterschiedliche Insuline einsetzbar, wie Human-, Rinder-, Schweine-, Ratten-, Hühner-, Fisch-, Guineaschwein-, Schaf- und Mausinsulin. Zusätzlich lassen sich die mAb's gemäß der Erfindung zur Bestimmung von menschlichen Insulinniveaus im Blut als diagnostische Hilfe einsetzen.

Als Stand der Technik wurde von Joyce A. Schroer et al in Journal of Immunology, Vol. 123 (2), August 1979, Seiten 670 bis 675 der Artikel "H-2-Linked Ir Gene Control of Antibody Responses to Insulin" veröffentlicht. Ferner ist von Joyce A. Schroer et al Monoclonal Antibodies in Endocrine Research, Fellows and Eisenbarth (editors), Raven Press, New York, 1981, Seiten 167 bis 179, erschienen.

Die Antikörper dieser Veröffentlichung sind ein Satz von vier Antikörpern, die durch eine der erfindungsgemäßen Zelllinie unterlegene Zelllinie hergestellt werden.

Ferner ist von Joyce A. Schroer et al "Mapping Epitopes on the Insulin Molecule Using Monoclonal Antibodies", European Journal of Immunology, 1983 (im Druck) veröffentlicht.

Über die Antikörper Angriffsstelle für eine antigene Determinante oder ein Proteinmolekül ist, insbesondere über die molekulare Basis von Hochaffinitäts-antigenantikörperwechselwirkungen auf Insulin, bisher wenig bekannt. Die vorliegende Erfindung lehrt die Entwicklung und die Verwendung monoklonaler Antikörper (mAb) gegen antigene Strukturen auf Insulin. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind Antiinsulinantikörper und werden durch mittels Hybridisierung von insulinimmunen Lymphknotenzellen und einer Myelomazelllinie SP2/O-Ag14 hergestellte Zelllinien sekretiert. Die Zelllinien und ihre entsprechenden monoklonalen Antikörper werden als AE9D6, DB9G8, CC9C10, CG7C7, BE3F9 und CE9H9 bezeichnet. Die mAbs, die durch diese Hybridome sekretiert werden, sind spezifisch für bestimmte Insulinaminosäuresequenzen und wirken daher als Diagnosereagentien zum Bestimmen des menschlichen Insulinniveaus.

Diese Antiinsulinantikörper ermöglichen auch das "Mapping" von antigenen Stellen auf Insulin. Da die monoklonalen Antikörper kreuzreaktiv sind, eignen sie sich auch für die Behandlung von Diabetes. Insbesondere verwendet die Behandlung von Diabetes sowohl Schweine- als auch Rinderinsulin, wie dieses in den Blutstrom injiziert wird. Die erfindungsgemäßen Testsets sind dazu fähig, diese Insulinarten zu unterscheiden und demzufolge dazu befähigt, das Niveau menschlicher Insuline, die durch den Körper sekretiert werden, differenziert von der Menge Fremdinsulin (Rind und Schwein), welches in den Körper injiziert wurde, anzugeben.

Sechs Antiinsulin mAbs wurden entwickelt. Die immunologischen Kreuzreaktivitäten dieser mAbs für Spezies-abhängige Varianten von Insulin oder chemisch modifiziertem Insulin wurden bestimmt. Diese mAbs binden an spe-

zifische Aminosäuresequenzen auf dem Insulinmolekül. Antikörper AE9D6 erkennt den Bereich um die Aminosäuresequenz Thr-Ser-Ile der A-Kette von Humaninsulin. Die anderen fünf mAbs reagieren ähnlich, obwohl die exakte Sequenz-Spezifität bisher noch nicht bestimmt worden ist.

Das körpereigene Immunsystem, insbesondere die Antikörper sekretierenden weißen Blutzellen, wirken durch Reaktion auf Fremdpartikel im Blutstrom. Einige Proteine, Antikörper (oder Immunglobuline) binden an und neutralisieren dadurch Fremdproteine, die in den Körper eintreten. D. Fremdproteine, die als Antigene bezeichnet werden, steuern den Anfang der Produktion eines komplementären Antikörpers; sie kombinieren, um einen Antigenantikörperkomplex zu bilden. Die Antikörpermoleküle enthalten Bindestellen, die spezifisch und komplementär zu den strukturellen Merkmale(n) oder Epitope des Antigens sind.

Insulin, welches eine Immunantwort hervorruft, von der gezeigt werden kann, daß sie unter einer MHC-verbundenen IR-Gensteuerung erfolgt, ist eines der physikalisch und chemisch besser charakterisierten Proteine. Das Insulinmonomere besteht aus zwei durch Zwischenkettendisulfidbindungen verbundenen Ketten.

Die A-Kette besitzt zwei Helixabschnitte, die durch einen Schleifenbereich, der durch eine zwischen den Ketten zwischen den Cysteinen 7 und 11 verlaufende Disulfidbrücke gebildet wird, getrennt sind; die B-Kette besteht aus Faltblattsegmenten an den Amino- und Carboxyenden, welche durch einen mittleren helikalen Bereich, der mit dem Carboxyterminalen Helixbereich der A-Kette verschlungen ist, verbunden sind.

Obwohl Insulin kein klassisches Antigen im Sinne einer

Fremdschubstanz ist, besitzt Insulin auch strukturelle Oberflächenmerkmale, die es dem Insulin erlauben, andere Moleküle zu binden. Die erfingungsgemäßen Antiinsulinantikörper sind die ersten Antikörper, die entwickelt wurden, um spezifisch an einem Insulinoberflächenmerkmal zu haften. Die duale Bindebefähigung dieser monoklonalen Antikörper ist insbesondere zur genauen Bestimmung von Insulinniveaus wichtig. Ein mAb allein ist nicht hinreichend, um das Insulinniveau adäquat zu bestimmen; die Verwendung von zwei mAb wird für den Spezifitätstest bevorzugt. Jegliche Kombination der sechs monoklonalen Antikörper gemäß der Erfindung kann paarweise in der Doppelbindungsassay (unten beschrieben) eingesetzt werden. Auf diese Art und Weise können Kombinationen von mAbs endogene Insulinsekretion (durch den Körper) von exogenem Insulin (injiziertes Rinder- oder Schweineinsulin) unterscheiden.

Das erfingungsgemäße Verfahren läßt sich mit jeder der bekannten Klonierungstechniken durchführen. Das nachfolgend beschriebene Verfahren soll die Erfindung nicht durch diese Beschreibung einschränken.

BALB/c Mäuse werden mit Human- oder Rinderinsulin immunisiert und entweder Lymphknotenzellen oder die Milzzellen werden entnommen. Die insulinimmunisierten Zellen werden sodann mit Myelomazelllinie SP2/O-Ag14 hybridisiert. Hybridzellen werden sodann in Mikrotiterplatten (wells) in HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) gegeben, um die nicht hybridisierten Zellen abzutöten, d.h., die nicht verschmolzenen Zellen. Von den überlebenden Hybridomen wird lediglich ein Teil den erwünschten Antikörper herstellen. Die Quellen, die positives Zellwachstum zeigen, werden durch Radioimmunassay untersucht, ob sie an Immunogen binden und anschließend durch begrenzte Verdünnung mit normalen peritonealen Makrophagen

kloniert. Klonierte Antiinsulinantikörper herstellende Zelllinien werden sodann in Gewebekultur gezüchtet, um zur Konservierung und späterer Verwendung eingefroren zu werden, oder als Vorrat für Zellen, welche in pristanbehandelte Mäuse injiziert werden, um große Mengen Antikörper herzustellen, oder um Antikörper enthaltende Überstände herzustellen.

Affinitätsbestimmungen

Die Affinität jedes Antikörpers für sein ihn hervorruftendes Insulin wurde durch kalte Inhibierung der Bindung des Antikörpers an 125-Jodinsulin in einem modifizierten Radioimmunassay (RIA) bestimmt. Es ergaben sich Bindungskurven bei konstanter Verdünnung der Immunsere, wobei jedoch Variation der Konzentrationen von gelabeltem Insulin oder einer Mischung von nicht gelabeltem und gelabeltem Insulin identisch waren. Dieses stellt sicher, daß 125 I-Insulin ununterscheidbar von nicht gelabeltem Insulin bei dieser Bestimmungsmethode ist. 20 μ l einer Verdünnung (Verdünnungsmittel 1 % BSA, 0,02 % Natriumazid in PBS) von Hybridomazellen, die 27 bis 75 % gelabelten Insulins banden, wurden mit 20 μ l nicht gelabelten Insulins mit einem Viertel \log_{10} Konzentration (6 gleiche Proben für jede Konzentration) über einen 100-fachen Konzentrationsbereich gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 20 μ l, die 10 bis 15 $\times 10^3$ cpm 125 I-Insulin enthielten, wurden zugegeben. Die Proben wurden vermischt und über Nacht bei 4°C ins Gleichgewicht gebracht. Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 50 μ l 27 %-igen Polyethylenglykols ausgefällt, welches 80 μ l/ml menschlichen AB-Serums als Carrier enthielt. Die Proben wurden bei 1000 X G 1 Stunde zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und das Präzipitat in einem Gammazähler gezählt. Die maximal ausfällbaren 125 I-Insulincounts wurden für jede Assay bestimmt, indem eine hochkonzentrierte Antikörperprobe verwandt wurde. Untergrundbindung

(5 bis 15 %) wurde durch Verwendung von drei Blindproben bestimmt: Lediglich Verdünnungsmittel, NMS im 1 : 5 Verdünnung, und P3-X63-Ag 8-Asziten bei 1 : 5 Verdünnung. Die Prozent Bindung bei jeder Konzentration kalten Insulins wurden verwandt, um die Konzentrationen gebundenen Insulins zu berechnen und sodann das an freie Anteilen gebundene. Die Affinitäten wurden aus den negativen Steigungen der unter Verwendung eines linearen Regressionsprogramms ermittelten Linien bestimmt.

Speziesabhängige Verdrängungsassays wurden genau wie oben durchgeführt, außer daß unterschiedliche Insuline eingesetzt wurden, um mit dem Birden des mAb an sein jodiertes Immunogen zu konkurrieren. Jede Konzentration Varianteninsulin wurde auf Bindungsinhibition über einen eine Million-fachen Konzentrationsbereich in 10-fach-Schritten getestet. Das kalte speziesvariante Insulin, 125 I-Insulin und die Antikörperverdünnungsmischung wurde lediglich 1 Stunde bei 2°C anstatt über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden sodann, wie oben beschrieben, bearbeitet und die Daten als Prozent Bindung gegen Konzentration Inhibitor (100 % Bindung wurde der Bindung in Abwesenheit des Inhibitors gleichgesetzt) ausgedrückt. Die 50 % Inhibierungspunkte für jede Kurve wurden bestimmt und dazu verwandt, I_{50} -Werte zu berechnen, indem die Konzentration des speziesvarianten Insulins das dazu benötigt wurde, 50 % Bindungsinhibition zu erhalten, durch die Konzentration kalten Immunogens, welches 50 % Inhibition ergab, dividiert wurde.

Doppelbindungsassays wurden ausgeführt, indem es entweder 100 μ l eines affinitätsgereinigten mAb oder einen 2mal 40 %-igen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Teils Aszitenfluid bei 1 : 100 Verdünnung erlaubt wurde, 4 bis 16 Stunden an eine Polyvinylplatte zu binden. Die

Platte wird anschließend dreimal mit PBS/TW20 gewaschen, gefolgt durch Absättigung aller nicht-spezifischen Bindungsplätze auf der Platte mit einer KLH-Lösung. (0,1% KLH in PBS/TW20) über 30 Minuten bei 22°C. KLH wurde als das Protein zur Sättigung nicht spezifischer Bindungsplätze ausgewählt, da es den niedrigsten Bindungsuntergrund hervorruft. 100 µl Rinderinsulin wurden in 1 µg/ml zugegeben, um alle Bindungsplätze abzusättigen. Vorläufige Experimente zeigten, daß 100 ng/ml Insulin hinreichend war, um alle Antikörperbindungsplätze zu sättigen, wobei ein 10-facher Überschuß zu Äquivalentbindungen führte und in allen nachfolgenden Assays eingesetzt wurde. Nicht gebundenes Insulin wurde durch 5-faches Waschen mit PBS/TW20 entfernt. Das zweite mAb, entweder biotinyliert für ELISA oder jodiert für RIA, wurde in 100 µl in 1 : 1000-facher Verdünnung zugegeben (83 ng Antikörper pro Probe) für biotinylierte Antikörper (vorläufige Experimente zeigten, daß alle Verdünnungen von 1 : 1000 bis 1 : 5000 leicht detektierbare ELISA-Werte, verglichen mit Untergrundblindprobengaben wobei das Insulin durch KLH ersetzt wurde) oder 7×10^4 - 1.2×10^5 cpm (7 bis 112 ng Antikörper pro Platte) für gelabelte Antikörper, und eine Bindung über Nacht ermöglicht. Die Platten wurden 5 X mit PBS/TW20 gewaschen und anschließend im Gammazähler gezählt oder für ELISA entwickelt. Da die biotinylierten mAbs manchmal hohe Untergrundbindung ergaben, wenn KLH Insulin in der Doppelbindungsassay ersetzte, wurden Blindproben, die eine hohe Insulinkonzentration (100-facher Überschuß) gemeinsam mit dem biotinylierten zweiten mAb für jedes Antikörperpaar zu jedem Assay gegeben wurde enthielten, eingeschlossen und lediglich die ELISA-Werte, die sich bei Zugabe von einem Insulin-Überschuss änderten als geeignet für Doppelbindung betrachtet. Jedes Antikörperpaar wurde 2 bis 5-mal mit RIA und 2 bis 5-mal mit ELISA getestet. Lediglich RIA-Werte, die mehr als das Doppelte des Untergrundes betrugen, wurden als signifikant betrachtet und eine Bindung von 0,2 bis 27 ng

M

- 8 -

125 I-Antikörper (2 bis 75×10^3 cpm) wurde detektiert. Die ELISA-Werte bei 492 nm bewegten sich zwischen 0,1 bis 1,9 optische Dichte über dem Untergrund. Doppelbindungsdaten werden in Tabelle 1 angegeben.

Antikörper produzierende sekretierende Zelllinien

Siehe Tabelle 2 für die Beschreibung der erfindungsgemäß verwandten Zelllinien.

Testsets

Testsets für den Einsatz der Zelllinien und ihrer mAb-Produkte können leicht im Laboratorium unter Verwendung konventioneller Techniken hergestellt werden. Sie können auf Kreuzspezifität oder Insulinniveauquantifizierung aufgebaut werden und für den allgemeinen erfindungsgemäßen Zweck, die Gegenwart eines speziellen Insulintyps zu bestimmen, ausgelegt werden.

Tabelle 1

Resultate der Doppelbindungsassay

	1	2	3	4	5	6
1		H	H	H	M	L
2	H		-	-	-	L
3	L	L		-	-	H
4	H	L	L		M	H
5	H	L	L	H		H
6	L	L	L	L	M	

H = Hoch, $>10 \times \text{bkg RIA}$ und $>1,0$ optische Dichte bei 492nm.

M = Mittel, entweder $>10 \times \text{bkg RIA}$ und 0,1 bis 1,0 optische Dichte bei 492 nm oder $>1,0$ optische Dichte bei 492 nm und 2 bis $10 \times \text{bkg RIA}$.

L = Niedrig, 2 bis $10 \times \text{bkg RIA}$ oder 0,1 bis 1,0 optische Dichte bei 492 nm.

- = kein dann detektierbares Binden, wenn das zweite mAb chemisch angebunden wird, jedoch dann, wenn dieses mAb zuerst auf die Platte aufgebracht wird, Bindung beobachtet wird.

Tabelle 2

Charakterisierung von 18 Antiinsulinhybridom-Antikörpern

mAbs	Zelllinie	Immunogen ^a	Isotypus	Affinitätskonstante		Spezifität
				K ₀ (M ⁻¹)		
1	AE9D6	Human	IgG1	3x10 ⁸ (0.98) ^b		eine Ketten-Schleife
2	DB9G8	Rinder	IgG1	5x10 ⁸ (0.95)		?
3	CC9C10	Rinder	IgG2a	2x10 ⁷ (0.73)		?
4	CG7C7	Human	IgG1	7x10 ⁷ (0.99)		?
5	BE3F9	Rinder	IgG2a	3x10 ⁷ (0.97)		?
6	CE9H9	Human	IgG1	2x10 ⁷ (0.96)		?

^a Für die Infusion wurden Myelomazellen eingesetzt, somatische Zellen waren BALB/c 12 bis 14 Tage primäre Immunlymphknotenzellen.

^b Korrelationskoeffizient von Scatchardauftragungen.